Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. med. H.-W. Schlipköter

Abteilung für experimentelle Pathologie

Leiter: Professor Dr. med. W. Hilscher

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERLEBENSZEIT VON HÜHNERKEIMLINGEN NACH INJEKTION VON NICKELCHLORID IN DAS DOTTERGEFÄSS-SYSTEM

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

GERALD PFEFFER

1984

UNIV.
LEIDEN
NED.

Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr.med. H.-W. Schlipköter

Abteilung für experimentelle Pathologie

Leiter: Professor Dr.med. W. Hilscher

Experimentelle Untersuchungen zur Überlebenszeit von Hühnerkeimlingen nach Injektion von Nickelchlorid in das Dottergefäßsystem

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Gerald Pfeffer

1984

Referent: Prof.Dr.med. W. Hilscher

Korreferent: Priv.-Doz.Dr. U. Stüttgen

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof.Dr.med. H. Th. Brüster

Referent:
gez.: Prof.Dr.med. W. Hilscher

Korreferent:
gez.: Priv.-Doz.Dr. U. Stüttgen

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A) EINLEITUNG	1
B) MATERIAL UND METHODEN	2
C) ERGEBNISSE	6
a. Versuchsgruppe I	6
b. Versuchsgruppe II	7
c. Versuchsgruppe III	8
d. Versuchsgruppe IV	9
e. Versuchsgruppe V	9
f. Versuchsgruppe VI	10
g. Versuchsgruppe VII	10
D) STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	11
E) DISKUSSION	14
F) ZUSAMMENFASSUNG	25
G) LITERATURVERZEICHNIS	26
H) LEGENDEN	29

A) E I N L E I T U N G

Nickel wird zu den möglicherweise essentiellen Spurenelementen gezählt, wirkt aber wie alle Mikroelemente in hoher Konzentration toxisch (Harper,1975). Bedeutsam für die toxische Wirkung der Schwermetalle ist die Neigung zur Komplexbildung mit Eiweißkörpern (Hamilton und Hardy, 1974; Kuschinsky,1976).

Die Schwermetallvergiftung kann u. a. am Kreislaufsystem zu Kapillarläsionen und degenerativen Veränderungen am Herzen führen (Rubanyi, 1980; Pschyrembel,1982).

Ziel dieser Arbeit war es, die toxische Wirkung von Nickel in Abhängigkeit von der Konzentration zu untersuchen. Als Versuchsobjekte wurden Hühnereier gewählt. Sie sind leicht zu beschaffen und relativ preiswert. Außerdem entsteht im bebrüteten Hühnerei sehr rasch ein sehr gut ausgebildeter extraembryonaler Dotterkreislauf, der ein ideales Untersuchungsobjekt für die Beobachtung von Gefäßschäden darstellt.

Wie Untersuchungen von Baumann (1984) gezeigt haben, sterben Hühnerkeimlinge nach Injektion von Cadmiumionen in den Dotter ab, weil das extraembryonale Gefäßsystem geschädigt wird. Meuser (1984) entwickelte eine Methode, die es ermöglicht, Substanzen in das Dottergefäßsystem zu injizieren. Die Wirkung des Nickels am Hühnerembryo wurde anhand der Überlebenszeit nach Applikation der Lösungen bestimmt.

B) MATERIAL UND METHODEN

Für die Experimente standen befruchtete Eier der Rasse "Weiße Leghorn" zur Verfügung, die vor der Injektion im EHRET-KLEINMOTORBRÜTER bei einer Temperatur von 37,8° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % drei Tage lang bebrütet wurden, ohne die Lage der Eier zu verändern.

Der Embryo lag dann auf der Oberfläche des Dotters; seine genaue Position ließ sich mittels Durchleuchten feststellen und auf der Eierschale markieren, wie Abb. 1 zeigt.

Über dem Keimling wurde die Kalkschale vorsichtig angesägt, ohne die darunter liegende Schalenmembran zu verletzen (Abb. 2). Die Fensterung erfolgte etwa in einer Größe von 1,5 x 2,0 cm, wobei die Schale mit einem feinen Raspatorium und einer spitzen Pinzette abgehoben werden konnte : Abb. 3 zeigt die unverletzte Schalenmembran.

Nach vorsichtigem Unterschichten dieser freiliegenden Membran mit einer temperaturangeglichenen Elektrolytlösung (Locke - Lösung), wodurch sich Schalen- und Dottermembran voneinander trennen, konnte ohne Gefahr für den Embryo das Ei breit eröffnet werden. Um ein Austrocknen des Keimlings zu vermeiden, wurde nochmals mit der Elektrolytlösung überschichtet. Abb. 4 zeigt den oben aufschwimmenden Embryo.

Für das weitere Vorgehen benötigte man eine entsprechende apparative Ausstattung (Abb. 5).

Unter dem Stereomikroskop wurde über der am besten zugänglichen Vene des extraembryonalen Kreislaufes, meistens bot sich die V. omphalomesenterica an, mit einem elektrolytisch geschärften Wolframdraht die Dotterhaut eröffnet (Abb. 6). Über die Entwicklung der Injektionstechnik fanden sich in der Literatur verschiedene Hinweise (Cole,1921; Faller,1948). Von Earle (1924) ist eine Methode der Gefäßinjektionen entwickelt worden, bei der die Injektionsflüssigkeit über eine Glaspipette mit dem Mund in das Gefäßsystem gedrückt wurde.

Bei den vorliegenden Experimenten erfolgte die Injektion über selbstgezogene Glaskanülen, die mittels Mikromanipulator geführt wurden. Die über der Flamme gefertigte Kanüle mußte an der Spitze mit einer scharfen Bruchkante versehen sein, um ein Wegdrücken der sehr feinen Gefäße zu verhindern.
Die Kanüle war über ein Zwischenstück mit einer 50 µl Hamilton-Spritze verbunden, deren Verwendung sich für die genaue Dosierung der sehr kleinen Injektionsmengen als vorteilhaft erwies.
Die Konzentrationen der verschiedenen Lösungen sind der Tabelle 1 zu entnehmen:

Tab. 1 : Konzentration der Lösungen

Locke-Lösung: 1000 ml NaCl / 37 ml KCl / 21 ml $CaCl_2$

$NiCl_2$ I : 0,05 µg / 10 µl Locke
$NiCl_2$ II : 0,10 µg / 10 µl Locke
$NiCl_2$ III: 0,50 µg / 10 µl Locke
$NiCl_2$ IV : 1,00 µg / 10 µl Locke
$NiCl_2$ V : 1,50 µg / 10 µl Locke
$NiCl_2$ VI : 2,00 µg / 10 µl Locke

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der Locke-Stammlösungen:

Tab. 2 : Stammlösungen für Locke-Lösung

NaCl : 9,427 g / 1000 ml aqua bidest
KCL : 12,0253 g / 1000 ml aqua bidest
$CaCl_2$: 15,8092 g / 1000 ml aqua bidest

Für jede der in Tabelle 1 aufgeführten Lösungen wurde eine Versuchsreihe mit 20 Embryonen durchgeführt, d. h. , die Untersuchung erfolgte an insgesamt 140 Keimlingen, wobei der Kontrollversuch mitlief, um Verfahrensfehler beim Injizieren berücksichtigen zu können.

Die Injektionszeit wurde so bemessen, daß die punktierte Vene sich beim Injizieren nicht oder nur unwesentlich erweiterte : Dabei ergab sich eine Zeitdauer von jeweils ca. 5 Minuten. Nach erfolgter Injektion können beim Entfernen der Kanüle wegen der iatrogenen Gefäßwandläsion nicht unerhebliche Blutungen auftreten. Um das Entstehen solcher Blutungen zu verhindern, wurde die Einstichstelle von oben mit der Kanüle leicht komprimiert, so daß es in den meisten Fällen nach etwa 3-5 Minuten nicht mehr oder vernachlässigbar gering blutete (Abb. 7).

Während der Injektion kam es zum Teil zu erheblichen Herzrhythmusstörungen, die unter dem Aufsichtmikroskop gut zu beobachten warer Die verschiedenen Schlagfrequenzen wurden folgendermaßen bestimmt:

Jeweils eine Schlaganzahl von 30 Schlägen wurde unter optischer Kontrolle mitgezählt, wobei die dafür benötigte Zeitspanne mit einer Stoppuhr festgehalten wurde. Auf 60 Sekunden hochgerechnet erhielt man die Herzfrequenz pro Minute.

Das anfängliche Problem des Verschlusses des Schalenfensters konnte folgendermaßen gelöst werden:

Eine auf die entsprechende Größe zugeschnittene Wachsplatte wie sie in dentalen Laboratorien benutzt werden, wurde in der Mitte mit einem Loch versehen und dann der Eiform angepaßt. Das Loch wurde mit einem Glasplättchen verschlossen, welches kurz erhitzt und am Rand angeschmolzen worden war.

Die so vorbereitete Verschlußplatte konnte danach mit einem heißen Wachsmesser am Ei festgewachst werden und bot neben dem sehr wichtigen Schutz vor der Austrocknung eine optimale Beobachtungsmöglichkeit durch das angelegte "Glasfenster" (Abb. 8). Es ließ sich also jederzeit der Entwicklungszustand des Keimlings kontrollieren, ohne daß der Verschluß geöffnet werden mußte. Dadurch konnten Infektionen oder sonstige Irritationen für den Keimling vermieden werden.

Diese Verschlußmethode erwies sich als äußerst vorteilhaft. Nach erfolgter Injektion wurden die Eier in gleicher horizontaler Lage weiterbebrütet und dann täglich kontrolliert. Waren die Embryos abgestorben, so wurde unter dem Stereomikroskop untersucht, ob und wo sich Gefäßläsionen zeigten, die als auslösende Todesursache infrage kommen konnten. Wurden solche Gefäßschäden nicht beobachtet, konnte davon ausgegangen werden, daß der Tod durch Kreislaufversagen mit Herzstillstand eingetreten war.

Der postoperative Untersuchungszeitraum erstreckte sich über vier Tage, wobei immer zur selben Tageszeit kontrolliert wurde. Alle Instrumente und Lösungen wurden vor dem Gebrauch sterilisiert.

C) E R G E B N I S S E

Von den 140 Embryonen, die für die Untersuchung zur Verfügung standen, wurden 120 mit unterschiedlich konzentrierten Nickelchloridlösungen behandelt und gegen eine Kontrollgruppe von 20 Keimlingen ausgewertet.
Insgesamt verstarben am ersten Tag 44 Embryonen (31, 4 %), am zweiten Tag 22 (15,7 %) und am dritten Tag 15 (10,7 %) und am vierten Tag 29 (20,7 %). Die restlichen 30 Keimlinge (21,5 %) überlebten alle vier Untersuchungstage.
Bei dieser Gesamtaufstellung bleibt unberücksichtigt, ob die Tiere behandelt oder unbehandelt waren (siehe Tab. 3).

Tab.3 : Aufschlüsselung des Gesamtergebnisses der Absterberate

1. Tag	44	31,4 %
2. Tag	22	15,7 %
3. Tag	15	10,7 %
4. Tag	29	20,7 %
später	30	21,5 %
total	140	100,0 %

Die einzelnen Versuche ergaben folgende Befunde :

a. Versuchsgruppe I :
In der ersten Versuchsreihe, die als Kontrollversuch mit Locke-Lösung durchgeführt wurde, verstarben zwei Embryonen am 3. Tag (10 %), sieben am 4. Tag (35 %) und elf lebten länger (55 %). Die geforderte Mindestüberlebenszeit von drei Tagen post injectionem überstanden 18 Tiere (90 %). Während der Injektion mit der Elektrolytlösung zeigte sich lediglich eine kurzzeitige Erhöhung der Herzfrequenz, wobei keinerlei Rhythmusstörungen auftraten. Es konnte ein Ruhepuls von 120 / min gemessen werden, der bei der Injektion auf

180 / min stieg. Die Ergebnisse des Kontrollversuches sind in Tabelle 4 ersichtlich :

Tab. 4:Versuchsgruppe I , Locke-Lösung

Ei-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
T 1.																				
a 2.																				
g 3.	+										+									
e 4.				+				+		+					+	+		+		+

b. Versuchsgruppe II :

In der zweiten Gruppe wurde die Injektion mit 0,05 µg Nickelchlorid in 10 µl Lösung vorgenommen. Wiederum stieg die Herzfrequenz auf annähernd 1,5-fache Werte an, wobei jetzt allerdings geringe Herzrhythmusstörungen beobachtet werden konnten.

Von den 20 Embryonen dieser Gruppe überlebten zwei (10 %) zwei Tage, neun (45 %) drei Tage und weitere neun (45 %) vier Tage. Somit waren hier keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe festzustellen.

Bei den gestorbenen Keimlingen waren keine Gefäßveränderungen erkennbar, so daß als Todesursache "Herzversagen" anzunehmen ist.

Die Ergebnisse dieser Gruppe entsprechen weitgehend denen der Kontrollgruppe, so daß auf eine tabellarische Auflistung verzichtet wurde.

c. Versuchsgruppe III :

Bei dieser Versuchsreihe traten zum ersten Mal als wahrscheinliche Todesursache Gefäßläsionen auf, die vor allem in der Nähe des Randsinus deutlich wurden. Diese Gefäßveränderungen konnten bei drei der 20 Embryonen festgestellt und als Hämorrhagien angesehen werden. (Abb. 9).

Die drei an Gefäßschäden eingegangenen Keimlinge hatten je zwei Tage überlebt und nahmen eine "Mittelstellung" ein; alle anderen starben bereits nach dem ersten Tag (2=10%), nach dem dritten Tag (5=25%) oder lebten länger (9=45%). (siehe hierzu Abb.1o u.11)

Der Tabelle 5 sind die Einzelergebnisse zu entnehmen :

Tab. 5: Versuchsgruppe III , 0, 1 µg Nickelchlorid

Ei-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
T 1.																				
a 2.					+						+									
g 3.	+						+						+							
e 4.		+							+					+		+			+	

Bei Embryo Nr. 11 trat nach erheblichen Rhythmusstörungen während der Injektion für eine Zeitspanne von etwa zwei Minuten ein Herzstillstand auf; danach setzten die Herzaktionen spontan wieder ein, allerdings mit massiven Arrhythmien. Wie aus der Tabelle hervorgeht, überlebte der Embryo nur den ersten Tag.

Bei allen Hühnerkeimlingen dieser Versuchsreihe stieg die Herzfrequenz unter der Wirkung des Nickels auf Werte zwischen 240 und 260 Schlägen pro Minute. Nach einem Tag konnte wieder eine "normale" Schlagzahl registriert werden.

d. Versuchsgruppe IV :

Die applizierte Menge an Nickelchlorid von 0,5 µg führte in dieser Gruppe innerhalb von vier Tagen zum Tode aller Embryonen. Lediglich bei zwei der Keimlinge konnten Gefäßveränderungen festgestellt werden, die wiederum in der Nähe des Randsinus lagen. Bei allen anderen muß "Herzversagen" als Todesursache angenommen werden. Von den 20 Keimlingen starben am ersten Tag drei (= 15 %), am zweiten Tag sechs (= 30 %), weitere drei am dritten Tag (= 15 %) und am vierten Tag die letzten acht (= 40 %).

Tabelle 6 faßt diese Ergebnisse noch einmal zusammen :

Tab. 6: Versuchsgruppe IV , 0,5 µg Nickelchlorid

Ei-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Tag 1.	+				+							+								
2.		+				+	+						+			+			+	
3.				+					+		+									
4.			+					+		+				+	+		+	+		+

Bei den Embryonen Nr. 9 und 11 traten die oben erwähnten Gefäßläsionen auf und wie in der Versuchsgruppe III überlebten auch diese beiden nur zwei Tage.

e. Versuchsgruppe V :

In diesem Versuch starben fünf Embryonen am ersten Tag (25%), zehn am zweiten Tag (50%) und fünf am dritten Tag (25%).

Bei den fünf Keimlingen, die am ersten Tag starben, setzten die Herzaktionen innerhalb der ersten Stunde nach der Injektion aus. Es konnten hierbei massive Rhythmusstörungen und ein erhebliches Absinken der Herzfrequenz beobachtet werden. Von den Keimlingen, die am zweiten Tag abstarben, traten bei vier der Embryonen Gefäßschäden auf, bei den anderen sechs Keimlingen kam es zum Herztod (Abb. 12). Die fünf am dritten Tag verstorbenen Keimlinge zeigten erhebliche Veränderungen des intraembryonalen Gefäßsystems, wobei ein großes Kopfgefäß enorm vergroeßert war, wie Abbildung 13 dokumentiert.

Kurz vor dem Herzstillstand konnten noch vereinzelte Herzaktionen beobachtet werden, wobei allerdings kein Blut mehr transportiert wurde und das Herz infolge des fehlenden venösen Rückstroms gewissermaßen "leer" schlug.
Die Ergebnisse sind tabellarisch erfaßt.

Tab. 7 : Versuchsgruppe V, 1,0 µg Nickelchlorid

Ei-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
T 1.	+	+	+								+						+			
a 2.				+	+			+	+	+				+	+	+			+	+
g 3.						+	+					+	+					+		
e 4.																				

f. Versuchsgruppe VI :
Bei Verwendung der in diesem Versuch gebrauchten Lösung mit 1, 5 µg $NiCl_2$ verstarben bereits am ersten Tag 16 Embryonen (80%). Bevor es zum endgültigen Herzstillstand kam, wurden ganz massive Rhythmusstörungen beobachtet, wobei es zu einer initialen Frequenzsteigerung auf über 280 / Min kam. Gefäßschäden konnten keine erkannt werden.
Die anderen vier Embryonen (20%) überstanden den zweiten Tag nicht. Auch bei diesen vier Keimlingen fanden sich keine Gefäßläsionen.
Auf eine tabellarische Darstellung konnte hier verzichtet werden, da die Eindeutigkeit der Ergebnisse für sich sprach.

g. Versuchsgruppe VII :
Wie erwartet, erwies sich in diesem Versuch die Konzentration von 2, 0 µg $NiCl_2$ auf 10 µl Lösung als letale Dosis, bei der sämtliche Keimlinge während der Injektion an akutem Herzversagen starben.
Wie im vorausgegangenen Versuch kam es kurzfristig zu einer starken Erhöhung der Herzfrequenz mit anschließender, sehr heftiger Arrhythmie und darauf folgendem Herztod.

D) S T A T I S T I S C H E A U S W E R T U N G E N

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wurden unter den Gesichtspunkten "Dosisabhängigkeit" und "Zeitabhängigkeit" statistisch ausgewertet. Das hierbei benutzte Computer-Programm wurde im Juni 1981 im Department of Biomathematics der University of California, Los Angeles, unter dem Titel : " BMDPLR - Stepwise Logistic Regression " entwickelt. Bei der Berechnung der LD 50 ergaben sich für die beiden Einflußgrößen Dosis (A) und Zeit (B) unterschiedliche Werte, die der Tabelle 8 zu entnehmen sind, in der außerdem die sogenannten 95%-Vertrauensgrenzen aufgeführt werden.

Tab. 8 : zeigt verschiedene LD 50 - Werte mit derjeweiligen Ober- und Untergrenze.

A	LD 50	UG	OG
0,00	97,6	89,7 -	117,0
0,05	93,9	86,7 -	106,0
0,10	94,0	82,8 -	117,0
0,50	55,0	46,5 -	64,9
1,00	29,4	19,7 -	38,2
1,5	/	/	/
2,0	/	/	/

B	LD 50	UG	OG
1	1,23	1,09 -	1,37
24	1,16	1,01 -	1,33
48	0,65	0,53 -	0,81
72	0,38	0,28 -	0,51
96	0,05	0,00 -	0,12

Zur Ermittlung der LD 50 - Werte kam die "Maximum - Likelihood - Methode" zur Anwendung, bei der die Regression mit Anteilziffern überlebender Tiere (bzw. im vorliegenden Fall Keimlinge) errechnet wird, wobei auf der Abszisse die Dosis und auf der Ordinate die logit - transformierte Anteilziffer der überlebenden erscheinen. Die logit - transformierte Darstellungsform zeichnet einen linearisierten Kurvenverlauf, der sich in einem Koordinatensystem als Gerade zeigt, in unserem Fall als Regressionsgerade.

Dies vereinfacht erheblich das Auffinden einer funktionalen Beziehung zwischen Dosis und Anteilziffer. Als weiteres wurde die Dosisabhängigkeit der Anzahl abgestorbener Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten bewertet und graphisch dargestellt (Abb.14). In Abbildung 15 wird der Zeitverlauf der Absterbeprozesse bei verschiedenen Dosen gezeigt. Vergleicht man die beiden Darstellungen miteinander, so lassen sich durchaus Parallelen erkennen. Diese werden noch deutlicher, wenn der logit - transformierte Anteil überlebender Embryonen als Funktion von Dosis und Zeit dargestellt wird : logit P = b 1 x Dosis + b 2 x Zeit + a. P ist der Anteil überlebender Keimlinge, b 1 und b 2 sind die zu schätzenden Regressionskoeffizienten, a fließt als Konstante mit ein.

Folgende Koeffizienten wurden berechnet:

Koeffizient	b 1 (Dosis)	= - 5,238
	b 2 (Zeit)	= - 0,069
	a (x99)	
	a (Konstante)	= 6,950

Standardfehler	für b 1	: 0,422
	für b 2	: 0,006
	für a	: 0,587

Der Quotient aus Koeffizient und dessen Standardfehler kann als t-Statistik betrachtet werden und gibt einen Hinweis auf die Signifikanz der bewerteten Parameter.

Koeffizient / Standardfehler
für b 1 : - 12,402
für b 2 : - 11,218
für a : 11,841

Hierbei zeigen sich aufgrund sehr ähnlicher Größenordnungen der errechneten Werte etwa gleichstarke Effekte von Dosis- und Zeitabhängigkeit, wobei diese Effekte für Dosis und Zeit hochsignifikant sind.

E) D I S K U S S I O N

Aus der Literatur ist bekannt, daß Hühnerkeimlinge sehr empfindlich auf die Einwirkung von Schwermetallen (Selen, Arsen, Cadmium, Blei und Quecksilber) reagieren: Birge und Robberts (1976) hatten jeweils eines der genannten Schwermetalle, aufgelöst in 0.1 ml destilliertem Wasser in das Eigelb injiziert. Die Konzentrationen lagen zwischen 0.001 ppm und 50.0 ppm, bezogen auf den flüssigen Inhalt der Eier (18.41 +/- 0.10 g).Pro Metallsalz waren neun Versuchsgruppen zu je 200 Eiern gebildet worden, denen Konzentrationen von 0,001 bis 50,0 ppm verabreicht worden waren. Den 200 Eiern der Kontrollgruppe war 0,1 ml destilliertes und desionisiertes Wasser in das Eigelb injiziert worden. Die Anzahl der geschlüpften Hühnchen der Kontrollgruppe war gleich 100% gesetzt worden. Neben der Überlebensrate (Prozentsätze der überlebenden Hühnchen) war die Mißbildungsrate (Prozentsätze der mißgebildeten Hühnchen, bezogen auf die jeweilige Überlebensrate) angegeben worden. Selen, Arsen und Cadmium erwiesen sich als extrem toxisch: Schon bei einer Konzentration von 0,001 ppm betrug hier die Überlebensrate nur noch 64, 65 bzw. 66%. Die LD50 lag bei 0,01, 0,05 bzw. 0,05 ppm.

Es blieb Baumann (1984) vorbehalten, festzustellen, warum es nach der Verabreichung von $CdCl_2$ in den Eidotter zum Absterben der Hühnerkeimlinge kommt. Wie seine Untersuchungen einwandfrei belegt haben, stirbt der Hühnerkeimling nach Gabe von $CdCl_2$ in den Dotter ab, weil Veränderungen des Dottergefäßsystems auftreten, die mit dem Leben des Keimlings nicht vereinbar sind. Wie Baumann (1984) ausführte, zeigten sich im Aspekt des extraembryonalen Dottergefäßsystems häufig sehr deutliche Veränderungen gegenüber der Norm. Allerdings ähnelten sich die Erscheinungsbilder des Dottergefäßsystems von noch lebenden und toten Keimlingen oft sehr. Als sichere Kriterien für einen lebenden Embryo erwiesen sich eine

noch vorhandene Blutzirkulation im Dotterkreislauf sowie ein "noch schlagendes Keimlingsherz". Er führte vier charakteristische Veränderungen des extraembryonalen Dottersackkreislaufes auf: (1) die Rarefizierung der Gefäße, (2) wabenförmige Gefäßnetze innerhalb des Sinus terminalis, (3) Blutungen, (4) wabenförmige Gefäßnetze außerhalb des Sinus terminalis.

Zum Verständnis der Wirkung von $NiCl_2$ auf das Herzkreislaufsystem des Hühnerkeimlings ist die Kenntnis der Entwicklung des extraembryonalen und intraembryonalen Gefäßsystems sowie des Herzens des Hühnerkeimlings erforderlich.

Die Ausbildung des Dottergefäßsystems beginnt mit dem Erscheinen von "Blutinseln" in der Area opaca im 4-Somiten-Stadium des Keimlings etwa zwischen der 26. und 29. Stunde nach Bebrütungsanfang (Rugh, 1974). Die Area opaca ist eine dunkelgelbe Zone, welche die durchsichtige, weißlich schimmernde Keimscheibe, die Area pellucida umgibt; sie selbst wird ihrerseits vom Dotterfeld, der Area vitellina, peripher begrenzt. Im Bereich der Area pellucida entwickelt sich der Embryo, aus der Area opaca gehen die extraembryonalen Keimlingsstrukturen hervor. Die Area vitellina stellt den außerhalb der Area opaca gelegenen Bereich dar, in welchem der Dotter nicht von den beiden Anlagen bedeckt wird. Die Entwicklung des eigentlichen Keimlings verläuft wie bei anderen Vertebraten über ein Morula-Stadium. Daran schließt sich ein aus zwei Keimblättern, dem Epiblasten und dem Hypoblasten bzw. primärem Ectoderm und Endoderm bestehendes Zwischenstadium an, aus dem ein aus secundärem Ectoderm, secundärem Endoderm und Mesoderm gebildeter Embryo hervorgeht. Das aus dem Epiblasten durch Einstülpung entstandene Mesoderm gliedert sich beiderseits in die Stammplatte und Seitenplatte auf, aus denen wiederum wichtige Organanlagen des

Embryos hervorgehen. Die Area opaca stellt hingegen zunächst nur eine dünne zweischichtige Platte dar, die aus extraembryonalen Ectoderm und Endoderm besteht. Vom hinteren Ende des im Epiblasten gelegenen Primitivstreifens, mit dem die Gastrulation des Embryo, d.h. die Bildung des intraembryosnalen Mesoderms eingeleitet wird, wandern auch Zellen aus, die zu extraembryonalen Mesodermzellen bzw. zu Mesenchymzellen werden und sich zwischen das extraembryonale Ectoderm und Endoderm der Area opaca schieben (Pflugfelder, 1970). Der eine Teil der Mesenchymzellen bildet das in der Fortsetzung der Splanchnopleura und Somatopleura der Seitenplatte des Embryo gelegene viscerale und parietale Blatt des extraembryonalen Mesoderms bzw. Mesenchyms. Beide Blätter umgeben einen Spaltraum , der als extraembryonales Coelom bezeichnet wird. Diesen Spaltraum füllen später die Blutgefäße aus. Der andere Teil der Mesenchymzellen, der an der Entstehung des visceralen und parietalen Mesenchymblattes nicht beteiligt ist, formiert sich an vielen Stellen innerhalb des Coeloms zu dicht gepackten Zellgruppen, aus denen in enger Nachbarschaft zum viszeralen Blatt Blutinseln entstehen.Die peripher gelegenen Mesenchymzellen der Blutinseln bilden sich zu Endothelzellen der späteren extraembryonal gelegenen Blutgefäße um, die zentral gelegenen Mesenchymzellen lösen sich von den peripher gelegen Zellen, separieren sich voneinander und werden zu Blutzellen.

Das Herz geht unterhalb des Darmkanals aus einer Verschmelzung zweier dicker Platten im Bereich der Splanchnopleura hervor. Diese Verdickungen sind schon nach 24 Stunden nachzuweisen. Im Stadium nach 29 Stunden Bebrütung besteht die Herzanlage aus einem geraden Rohr,dessen kompakte Wände zum Epimyocard gehoeren.Das Rohr setzt sich nach vorn in die zwei ventralen Aortenwurzeln fort und nach hinten in zwei große Venenstämme, die Venae omphalomesentericae. Von nun an kann sich das Herzrohr nicht mehr nach vorn und hinten ausdehnen,da es durch die zur selben Zeit entstehenden großen Blutgefäße behindert wird.Das Herz wird nach rechts abgebogen,und im Zuge dieser Biegung entstehen die Herzkammern.Die beiden Venae omphalomesentericae münden im Sinus bzw.dem Atrium,den späteren Vorhöfen.Vor den Ventrikeln liegt der Arterienstamm,der sich in die beiden ventralen Aortenwurzeln aufzweigt.Die ventralen Aortenwurzeln

nähern sich seitlich den Wänden des Darmkanals und werden zum ersten Paar der Aortenbögen,das auch als mandibulärer Aortenbogen oder I.Aortenbogen bezeichnet wird.Dorsalwärts biegen die Aortenwurzeln zu beiden Seiten des Darmes um. Sie bilden dort die dorsalen Aortenwurzeln,die sich in die Arteriae omphalomesentericae auflösen und dann im Stadium nach 33 Stunden,am Ende der Somitenregion,im Plexus der Blutinseln enden.Die dorsalen Aortenwurzeln beginnen nach 48stündiger Bebrütung mit der Verschmelzung zu einer einzigen dorsalen Aorta.Ihre endgültige Anlage ist nach vier Tagen abgeschlossen.Im Plexus der Blutinseln an der Peripherie des Embryos -also in einem Bereich,der ursprünglich zur Area opaca zählte- haben inzwischen, wie bereits ausgefuehrt, die Differenzierungsvorgänge eingesetzt. Die Kapillaren anastomosieren nach ihrer Entstehung und fließen zu Dottervenen und -arterien zusammen,die sich an die Venae und Arteriae omphalomesentericae anschließen (Gonzales-Cruzzi, 1958; Münterer, 1973), wie noch beschrieben wird.
Die ersten Herzkontraktionen sind nach 37 Stunden nachweisbar,wenn die Blutgefäße,die unabhängig voneinander im Embryo und im extraembryonalen Raum entstehen, miteinander verbunden sind. Die aus dem extraembryonalen Raum hervorgehenden Elemente des Blutgefäßsystems werden in das Kreislaufsystem mit einbezogen , das sich nach und nach zwischen dem Embryo und den außerhalb der eigentlichen embryonalen Zone liegenden Bereichen ausbildet.Nach etwa 44 Stunden wird der Herzrhythmus regelmäßig. Das extraembryonale Dottersackgefäßsystem nimmt frühzeitig mit der entstehenden Herzanlage Verbindung auf: Die beiden Dottervenen (Venae vitellinae), deren intraembryonale Abschnitte Venae omphalomesentericae genannt werden, münden in den Sinus venosus, der dem entstehenden Herzen vorgeschaltet ist.

Zwischen dem zweiten und dritten Bebrütungstag nimmt es Kontakt zu den intraembryonalen Gefäßen auf, welche - wie die im Bereich der Area opaca entstehenden extraembryonalen Gefäße - durch Konfluenz ehemaliger Blutinseln gebildet werden. Ab dem Zeitpunkt des Erscheinens extraembryonaler Gefäße wird die Area opaca als Area vasculosa bezeichnet. Vom zentral gelegenen Abschnitt der Area vasculosa aus wachsen größere Gefäße auf den Embryo zu, überqueren

den äußeren Rand der Area pellucida und gewinnen Verbindung mit den Gefäßen des Embryo. Am Ende des dritten Bebrütungstages ist ein funktionsfähiger Dotterkreislauf entstanden, in welchem das Blut in allen Abschnitten zirkuliert.

Im venösen System ist die Vena vitellina dextra und sinistra und die Vena vitellina anterior und posterior zu unterscheiden, die alle in den unpaaren Ductus venosus des Embryo einmünden. Im arteriellen System findet man die Arteria vitellina dextra und sinistra, die aus den beiden dorsalen Aorten entspringen. Diese stehen ihrerseits über die fünf Kiemenbogenarterien mit den beiden ventralen Aorten in Verbindung. Wie bereits beschrieben, nehmen die letzteren ihren Ursprung aus dem frühembryonalen Ventrikel. Peripher münden die extraembryonalen Gefäßnetze in den Sinus terminalis, der die Grenze zwischen Area vasculosa und Area vitelina markiert. Im Laufe der weiteren Entwicklung schiebt sich die Area vasculosa kontinuierlich immer weiter über den Dotter, auf Kosten einer sich stetig verkleinernden Area vitellina. Der Sinus terminalis gleitet so scheinbar peripherwärts. In Wirklichkeit jedoch vereinigen sich die stets aus konfluierten Blutinseln neu entstehenden äußersten Gefäße der Area vasculosa zu einem neuen Sinus terminalis, während gleichzeitig durch Umbau von bis dahin zirkulär orientierter Abschnitte des alten Sinus radiär zur Peripherie hin ausgerichtete Gefäße entstehen. Am fünften Bebrütungstag senken sich die Arterien des Dotterkreislaufes, die bisher neben den Venen verliefen, in Ausstülpungen des extraembryonalen Gewebes der Area vasculosa in die Dottersubstanz hinab. Zunächst werden sie nur teilweise von Dottermaterial überlappt. Dadurch bedingt verändert sich - allerdings nur scheinbar - das Kaliber der Arterien. Schließlich überdeckt die Dottersubstanz mit dem aufliegenden venösen Gefäßnetz die großen Arterien vollständig. Sichtbar bleiben nur die aus der Tiefe steil emporsteigenden kleinen Arterien, die sich an der Oberfläche aufteilen. Auf diese Weise bildet sich ein aus mehreren Lagen bestehendes Gefäßsystem, das in Form tiefer Rillen in den Dotter einschneidet. Dadurch wird die Oberfläche des extraembryonalen Gefäßsystems beträchtlich vergrößert. Mit Ausbildung des Allantoissackes, dessen Gefäße den Gasaustausch ab dem zehnten Bebrütungstag übernehmen, und mit zunehmender Absorption der

Dottersubstanz schrumpft der Dotter und wird kurz vor dem Schlüpfen des Hühnchens in die Abdominalhöhle aufgenommen, die sich hinter ihm verschließt (Balinsky, 1975). Mit diesen regressiven Veränderungen einhergehend erfolgt die Rückbildung des Dottergefäßsystems.

Das paarig angelegte intraembryonale Gefäßsystem entsteht erst etwas später als das extraembryonale. Man unterscheidet zwei ventrale und zwei dorsale Aorten,die durch die Kiemenbogenarterien miteinander in Verbindung stehen. Wie das paarig angelegte Herz gehen sie aus Gewebsmaterial hervor,das aus dem embryonalen Abschnitt des visceralen Mesoderms stammt.Die rechte und linke vordere sowie die beiden hinteren Cardinalvenen,die in je eine linke und rechte Vena cardinalis communis münden,sollen sich dagegen von Mesenchym ableiten,das in unmittelbarer Nachbarschaft der beiden Vor- und Urnieren liegt (Balinsky,1975). Beide Venae communes wiederum münden in den Sinus venosus,der dem entstandenen Vorhof vorgelagert ist.

Im Gegensatz zu Baumann (1984), der den von ihm verwandten Schadstoff - es handelte sich um $CdCl_2$ - in den Dotter injiziert hatte, wurde in der vorliegenden Arbeit direkt in das Gefäßsystem injiziert. Wie Untersuchungen von Meuser (1984) gezeigt hatten, wird durch intravenöse Injektion von $CdCl_2$ in das extraembryonale Gefäßsystem das Keimlingsherz geschädigt. Es kommt zu Herzrhythmusstörungen und schließlich zum Herzstillstand.
Der Keimling stirbt ab. Es lag nahe, anzunehmen, daß sich das Keimlingsherz nach intravasaler Injektion von $NiCl_2$ ähnlich verhalten würde wie nach einer $CdCl_2$-Injektion. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ebenso verfahren: Injiziert wurde in die linke oder rechte Vena omphalomesenterica, je nachdem, welche von beiden stärker ausgebildet war.

Sowohl bei den Kontrollkeimlingen als auch bei den mit $NiCl_2$ behandelten Embryonen kam es unmittelbar im Anschluß an die Injektion zu Änderungen der Herzaktion. Bei den Keimlingen der Kontrollgruppe und der 0,05-µg-Gruppe äußerte sich dies in einer Zunahme der Herzfrequenz.

Nach Injektion von 0,1 µg NiCl2 traten zusätzlich Herzrhythmusstörungen auf, die indessen nach 1 Stunde Versuchsdauer wieder abebbten. Dagegen klang die stark erhöhte Herzfrequenz erst nach 24 Stunden Versuchsdauer wieder ab. Außerdem traten bereits bei dieser Dosis Gefäßveränderungen unter dem Bild von Hämorrhagien auf.

Bei der vierten Versuchsgruppe,die mit o,5 µg NiCl2 behandelt wurde,zeigte sich eine andere Art von Gefäßveränderungen :
Es kam zu starken Dilatationen der Dottergefäße,wodurch das Blut regelrecht "versackte" und sich eine Stase ausbildete. Dies war für die Keimlinge,bei denen diese Veränderungen auftraten,nicht mit dem Leben vereinbar.
Wie in der 0,1 µg-Versuchsgruppe konnten auch hier wieder sowohl eine Erhöhung der Herzfrequenz als auch Rhythmusstörungen festgestellt werden.Das Herz der meisten Embryonen dieser Gruppe wurde durch die applizierte Menge von NiCl2 dermaßen geschädigt,daß alle bis auf zwei Keimlinge an Herzversagen starben.
Die nächste Versuchsreihe wurde mit einer Menge von 1,0 µg NiCl2 durchgeführt.Wie erwartet traten auch hier die häufigeren Veränderungen am Keimlingsherz auf.So setzten die Herzaktionen bei fünf der Embryonen bereits innerhalb der ersten Stunde post injectionem aus,wobei diesmal ein dem Herzstillstand vorausgehendes starkes Absinken der Herzfrequenz mit massiven Arrhythmien beobachtet werden konnte.
Bei vier der Keimlinge traten Gefäßschäden auf,die denen der vorausgegangenen Gruppe entsprachen (Dilatation mit einhergehender Stase) und zwei Tage nach der Injektion zum Tode der Embryonen führte.Sechs weitere Keimlinge verstarben am selben Tag an Herzversagen.Wiederum ging dem eigentlichen Herzstillstand eine ausgeprägte Rhythmusstörung voraus.
Die fünf noch überlebenden Keimlinge gingen am dritten Tag zugrunde und zeigten starke i n t r a embryonale Gefäßalterationen : Es handelte sich um eine massive Dilatation eines großen Kopfgefäßes (es konnte nicht sicher geklärt werden, ob es sich um die Arteria carotis interna handelte oder um die Vena cardinalis anterior), mit "Versacken" des Blutes in diesem Bereich. Die damit verbundene Unterversorgung der übrigen Embryonalstrukturen führte zum Tode.

Bei allen fünf Keimlingen kontrahierte sich der Herzmuskel kurz vor dem Herzstillstand nur noch sehr unregelmäßig, wobei kein Blut mehr transportiert wurde: Infolge des fehlenden venösen Rückstroms lag eine Blutleere vor. Somit konnte die Todesursache eindeutig den Gefäßveränderungen zugeordnet werden.
Die letzten beiden Versuchsgruppen wurden mit 1,5 µg bzw.2,0 µg NiCl2 behandelt.Nach Applikation beider Dosen kam es nicht zur Ausbildung von Gefäßläsionen.Sämtliche Keimlinge verstarben nach massiven Arrhythmien und initialen Herzfrequenzsteigerungen auf Werte von über 280 / Min. an Herzversagen,wobei der Herztod bei den Keimlingen der 2,0 µg-Gruppe bereits am Ende der Injektion eintrat.—Betrachtet man die Todesursachen rein quantitativ,so ist festzustellen,daß nur bei 14 der 120 behandelten Eier Gefäßveränderungen auftraten,die mit hoher Wahrscheinlichkeit als Todesursache anzusehen sind.Bei den anderen 106 behandelten Keimlingen muß als Todesursache Herzversagen angenommen werden.

Da die Gefäßläsionen im Dottergefäßsystem und die des intraembryonalen Kreislaufes nur bei den mit NiCl2 behandelten Embryonen auftraten und in der Kontrollgruppe nicht feststellbar waren,müssen diese Veränderungen eindeutig der Wirkung des Nickels zugeschrieben werden.Dieses Ergebnis entspricht den quantitativen Analysen Baumanns (1984),der deutlich cadmiumspezifische Gefäßalterationen feststellen konnte. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit war die Absterberate dosis- und zeitabhängig.
Bei Baumann allerdings waren die am häufigsten beobachteten Veränderungen Blutungen,die er mit 32,1% aller festgestellten Gefäßläsionen einwandfrei der Cadmiumwirkung zuordnete.Die durch Nickel bedingte Zirkulationsstörung in Form von Hämorrhagien trat bei zwei der 14 an Gefäßalterationen gestorbenen Embryonen auf,was einem Prozentsatz von 14,3% entspricht.
Die anderen Gefäßveränderungen,die nach Gabe von Nickel auftraten, lassen sich mit den Ergebnissen der Untersuchung von Baumann nicht vergleichen,da sie anders geartet sind.Die Gefäßdilatationen des extraembryonalen Dottergefäßsystems zeigten sich bei sieben der 14 Embryonen.Sie traten mit 50% der Blutgefäßläsionen am häufigsten als Todesursache auf und können ebenso deutlich wie die Blutungen auf die

Wirkung des Nickels zurückgeführt werden,da auch sie in der Kontrollgruppe nicht feststellbar waren.
Mit 35,7%, das heißt bei 5 von 14 Keimlingen, die Gefäßveränderungen aufwiesen, wurde die massive Erweiterung des großen Kopfgefäßes als Todesursache angenommen. Eine solche Veränderung trat bei den Versuchen von Baumann (1984) nicht auf. Da diese Alteration ebenso wie die vorhergehenden nur bei den mit NiCl2 behandelten Hühnereiern auftrat,muß auch für sie die toxische Wirkung des Nickels verantwortlich gemacht werden.
Die bei weitem häufigste Todesursache "Herzstillstand" konnte bei 106 der 120 mit Nickel behandelten Keimlinge beobachtet werden.Jedoch starben auch bei der Kontrollgruppe,die mit Locke - Lösung behandelt wurde,innerhalb der geforderten Mindestüberlebenszeit von drei Tagen post injectionem,zwei der Keimlinge.Da aber der Einfluß des NiCl2 auf das Keimlingsherz bei steigender Konzentration immer deutlicher wurde,wird als Todesursache für diese Keimlinge ein Trauma des Eingriffes vermutet.

Der erwähnte Mindestüberlebenszeitraum von drei Tagen nach Applikation der Lösungen wurde aus folgender Überlegung gewählt : Um eine Schädigung von Nervenstrukturen durch die Gabe von NiCl2 am Herzen zu vermeiden,wurde der Zeitraum gewählt,in dem das Herz noch nicht innerviert ist.Nach Jones (1958) dauert diese Periode bis zum 6.Bebrütungstag.Wenn also am dritten Tag injiziert worden war und die Embryonen bis einschließlich zum 6.Tag an Herzstillstand abstarben, so kann mit einiger Sicherheit davon ausgegangen werden,daß der Herzstillstand "rein herzbedingt" war. Als Todesursache kommen entweder Veränderungen der Herzmuskelzellen (histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden nicht durchgeführt), oder aber Störungen im Elektrolythaushalt der Herzmuskulatur infrage. Da Nickel als bekanntermaßen kardiotrope Substanz Ca++ kompetitiv verdrängt,nimmt es Einfluß auf die elektromechanische Kopplung und damit auf die Hämodynamik (Späth,1982). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß auch die bei den vorliegenden Versuchen aufgetretenen Rhythmusstörungen Folge einer Elektrolytstörung sind. Dafür spricht die bei steigender NiCl2-Konzentration kürzere Überlebenszeit der Keimlinge,die an Herzversagen starben.

Die Toxizität des Nickels zeigte sich daran,daß bei sämtlichen Konzentrationen,also von 0,05 µg NiCl2 bis 2,0 µg NiCl2,Veränderungen am Keimlingsherz auftraten; angefangen von leichten Rhythmusstörungen, die sich schnell wieder normalisierten, bis hin zum raschen Herzstillstand,in Abhängigkeit von Dosis und Zeit. Weitere Untersuchungen, vor allem histologische und elektronenmikroskopische, werden klären müssen, ob und welche Strukturen der Muskelzellen letztlich so geschädigt werden, daß es zum Herzversagen kommt. Faßt man die Absterberate der Hühnerkeimlinge als Folge von primärem Herzstillstand oder von primären Gefäßläsionen mit nachfolgendem Herzstillstand auf - jedoch beide als Auswirkung des gleichen toxischen Geschehens, so ergibt sich ein kontinuierlicher Anstieg geschädigter Embryonen, und zwar sowohl mit zunehmender Versuchsdauer (Einflußgröße:Zeit), als auch mit steigender Nickelkonzentration (Einflußgröße:Dosis).

Zusätzlich können durch die erfolgten statistischen Auswertungen zwei weitere Aussagen gemacht werden : 1.je höher die Konzentration ist, desto deutlicher tritt der schädigende Faktor einer zunehmenden Versuchsdauer zutage;2.je länger die Versuchsdauer ist,um so mehr kommt der schädigende Faktor einer Konzentrationserhöhung zur Ausprägung.Hierbei konnten aufgrund sehr ähnlicher Größenordnungen der errechneten Werte etwa gleichstarke Effekte von Dosis - und Zeitabhängigkeit herausgefunden werden,wobei sich diese Effekte für Dosis und Zeit als hochsignifikant erwiesen. Es muß noch die Frage diskutiert werden,inwieweit die Cl^-- Konzentration bei der Mischung von NiCl2 mit der Lockelösung dermaßen ansteigt,daß die aufgetretenen Schädigungen durch die höheren Chlorionenanteile bedingt sind. Hierzu wurde das Verhältnis der Cl^- Konzentration der Lockelösung zur Cl^- Konzentration der letalen Dosis von 2,0 µg NiCl2 in 10 µl berechnet : Die Molaritäten der Chloridionen der Locke-Stammlösung teilten sich folgendermaßen auf :

NaCl 0,16 mol/KCl 0,16 mol/CaCl2 0,32 mol

Aus der Zusammensetzung dieser drei Substanzen ergab sich für die Gesamtmenge von 1058 ml ein Anteil von 172,64 mol Cl^- Ionen,nach der

Formel : 1000 x 0,16 + 37 x 0,16 + 21 x 0,32 = 172,64 mol . Bezogen auf 1ml ergab sich eine Konzentration von 0,163 mol (Formel: 172,64: 1058 = 0,163 mol Cl- /ml). Dies entspricht einer Molarität von 1,63 µmol Cl^-/10 µl Lockelösung. Für die letale Dosis von 2,0 µg NiCl2 / 10 µl Lösung konnte eine Konzentration von 0,03 µmol Cl^- errechnet werden. Aus diesen beiden Werten ergab sich,daß die Chlorionenkonzentration in der Lockelösung 54,33 mal so hoch war und somit die zusätzlichen Chloridionen des NiCl2 mit Sicherheit nicht für die Gefäß- und Herzschäden verantwortlich sind. Auch die Erhöhung der Osmolarität durch NiCl2 fällt bei 2,0 µg in 10 µl Lösung mit 1,24% vernachlässigbar gering aus,da die Lockelösung 0,322 osmolar und NiCl2 0,004 osmolar sind und somit die osmolare Konzentration der Lockelösung etwa 80 mal höher ist.

F) Z U S A M M E N F A S S U N G

Bei drei Tage alten Hühnerembryonen (insgesamt 140) wurden verschieden konzentrierte Nickelchloridlösungen in das Dottergefäßsystem injiziert. Anschließend wurden die Keimlinge weiterbebrütet und bis zum vierten Tag nach Applikation des Nickels täglich kontrolliert. Die Wirkung des Nickels zeigte sich in einem signifikanten Anstieg der Absterberate in Abhängigkeit von Dosis und Zeit. Zwischen einer Kontollgruppe und der Versuchsgruppe mit dem geringsten Nickelanteil von 0,05 µg zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Als Todesursache kamen Veränderungen sowohl des e x t r a - als auch des i n t r a embryonalen Gefäßsystems und Herzversagen infrage, wobei diese unterschiedlichen Todesursachen in der genannten Reihenfolge bei steigender Konzentration auftraten. Weiterhin traten während der Injektion der $NiCl_2$- Lösungen z. T. massivste Herzrhythmusstörungen mit Frequenzsteigerungen auf mehr als das Doppelte des Ruhepulses auf, wobei auch hier eine deutliche Korrelation zur Konzentration bestand.

G) L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Balinsky, B.J.:
An introduction to embryology.
4. Edition, W.B. Saunders com., Philadelphia, London, Toronto, 1976.

Baumann, L.:
Die Wirkung von Cadmiumchlorid auf das extraembryonale Gefäßsystem des Hühnerembryos zwischen dem dritten und achten Bebrütungstag.
Inaugural-Dissertation Düsseldorf, 1984.

Birge, W.J., Robberts, O.W.:
Toxicity of metals to chick embryos.
Bull. Environ. Contam. Toxicol. 16: 319-324, 1976.

Cole, F.J.:
The history of anatomical injection. Studies in the history and method of science.
Oxford university press, Cambridge, 1921.

Earle, W.R.:
A simple aparatus and method for the injection of early chick embryos.
J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 40: 171-175, 1924.

Faller, A.:
Die Entwicklung der makroskopisch-anatomischen Präparierkunst von Galen bis zur Neuzeit.
Acta Anat. Suppl.7, Basel 1948. Sonderausgabe.

Gonzales-Cruzzi, F.:
Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study.
Am. J. Anat. 130: 441-460, 1958.

Hamilton, H.:
Industrial toxicology.
Publishing Sciences Group, NC - Acton, Massachusetts.
Third edition, 1974.

Harper, H.A., Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L.:
Physiologische Chemie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975.

Jones, D.S.:
Effects of acetylcholine and adrenaline on the experimental uninnerved heart of the chick embryo.
Anat. Rec., 130: 253-260, 1958.

Kuschinsky, G., Lüllmann, H.:
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
7. überarbeitete und erweiterte Auflage.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1976.

Meuser, S.:
Experimentelle Untersuchungen zur Überlebenszeit von Hühnerkeimlingen nach Injektion von Cadmiumchlorid in das Dottergefäßsystem.
Inaugural-Dissertation Düsseldorf, 1984.

Münterer, M.:
Experimentelle Untersuchung der Kardinalvenenentwicklung bei drei- bis fünftägigen Hühnerembryonen.
Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 140: 351-365, 1973.

Pflugfelder, O.:
Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte und Entwicklungsphysiologie der Tiere.
2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1970.

Pschyrembel, W.:
Klinisches Wörterbuch mit klinischen Syndromen.
de Gruyter Verlag, Berlin, New York, 1982.

Rubanyi, G. et al.:
Cardiovascular actions of nickel ions.
Acta physiol. Acad. Sci. Hung., 55: 345-353, 1980

Rugh, R.:
A guide to vertebrate development.
7th ed. Burgess Publishing Co., Minnesota, 1977.

Späth, G.:
Vergiftungen und akute Arzneimittelüberdosierungen.
2., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage.
de Gruyter Verlag, 1982.

H) L E G E N D E N

zu Abb. 1: Markierung der Embryoposition auf der Schale.

zu Abb. 2: Sägeschnitte in der Schale, für die Fensterung.

zu Abb. 3: Unverletzte Schalenmembran nach Abheben der Kalkschale.

zu Abb. 4: 72 Stunden alter Hühnerembryo nach Entfernen der Kalkschale und der Schalenmembran mit gut ausgebildetem extraembryonalem Dottergefäßsystem.

zu Abb. 5: Auflichtpräpariermikroskop (Fa. Zeiss) mit angebauter Spiegelreflexkamera (Fa. Leitz) und Mikromanipulator.

zu Abb. 6: Über einer Venentrifurkation ist die Dottermembran eröffnet und zur Seite geklappt worden.

zu Abb. 7: Die Einstichstelle wird nach erfolgter Injektion mit der Glaskanüle komprimiert, um so eine Blutstillung zu erreichen.

zu Abb. 8: Mit Wachsplatte und angeschmolzenem Glasplättchen verschlossene Schalenfensterung nach der Injektion.

zu Abb. 9: Blutungen im Bereich des Randsinus nach Applikation von 0.1 µg Nickelchlorid.

zu Abb.10: Massiv dilatierte Dottergefäße innerhalb des Sinus terminalis, die nach Gabe von 0. 5 µg Nickelchlorid zum Absterben des Hühnerembryos führten.

zu Abb.11: Durch Gefäßerweiterung bedingte Stase in der Peripherie des Dottergefäßsystems.

zu Abb.12: Zwei Tage nach der Injektion von 1.0 µg Nickelchlorid abgestorbener Hühnerembryo, bei dem ein Herzstillstand als Todesursache infrage kommt.

zu Abb.13: Massive Dilatation eines großen Kopfgefäßes führte drei Tage nach der Injektion zum Tode dieses Embryos. Über der Augenanlage erkennt man die große Blutansammlung.

zu Abb.14: Dosisabhängigkeit der Anzahl abgestorbener Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten.

zu Abb.15: Zeitverlauf der Absterbeprozesse bei verschiedenen Dosen.

Abbildungen // Anhang

Abb.1

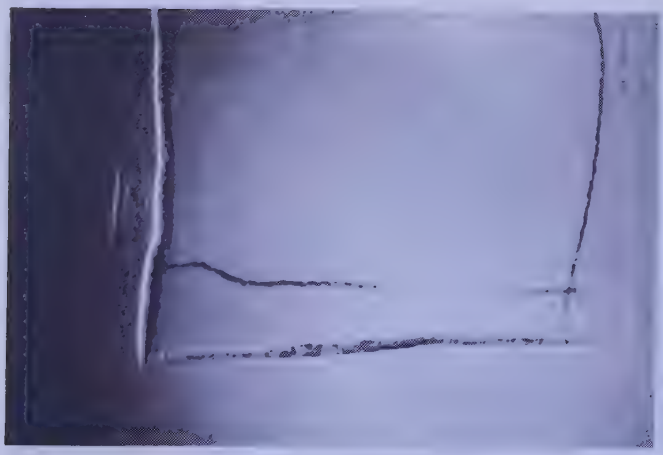

Abb.2

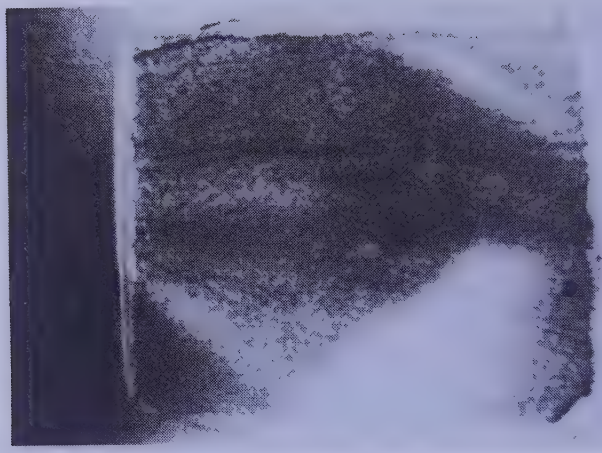

Abb.3

Abb.4

Abb. 5

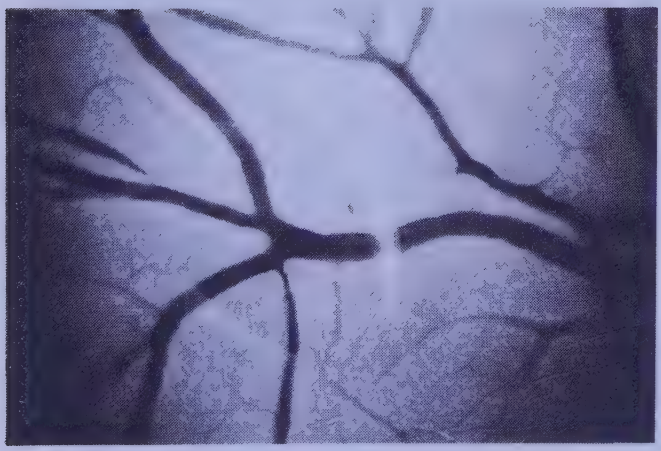

Abb. 6

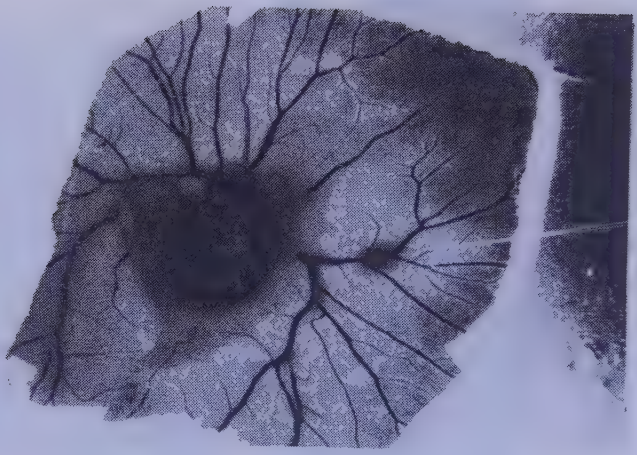

Abb. 7

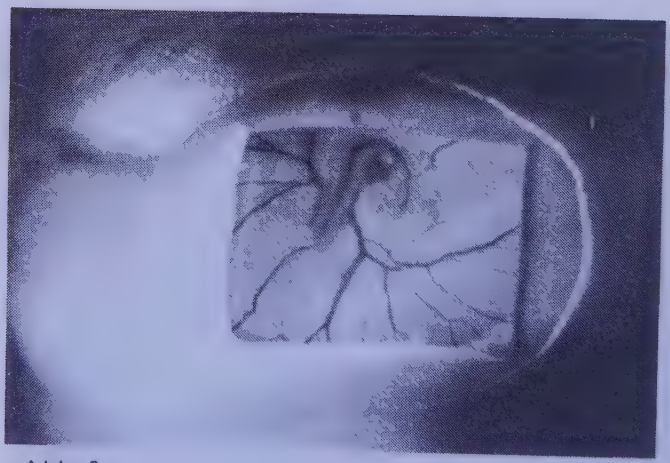

Abb. 8

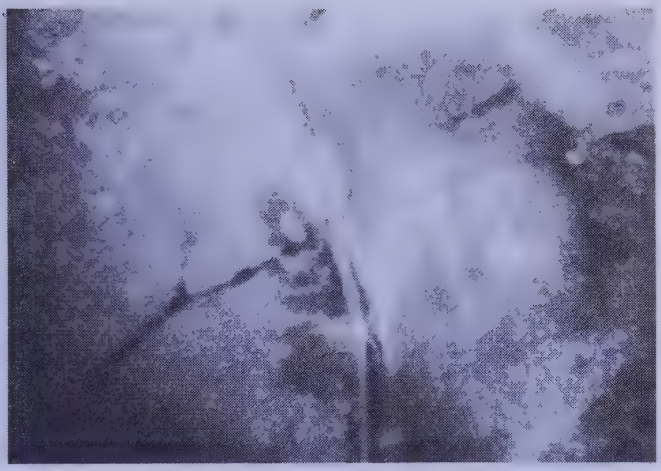

Abb. 9

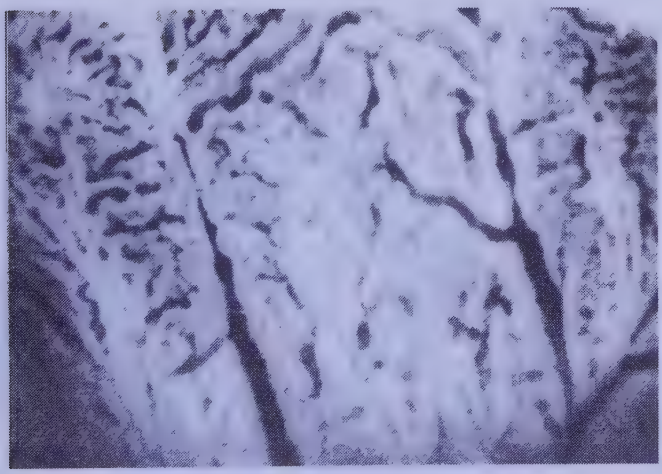

Abb. 10

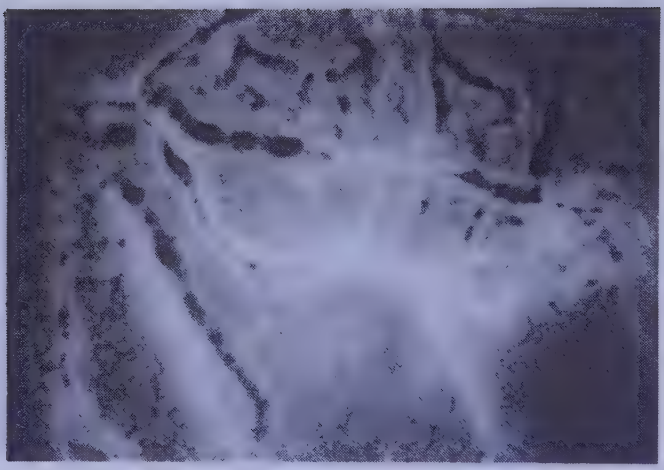

Abb. 11

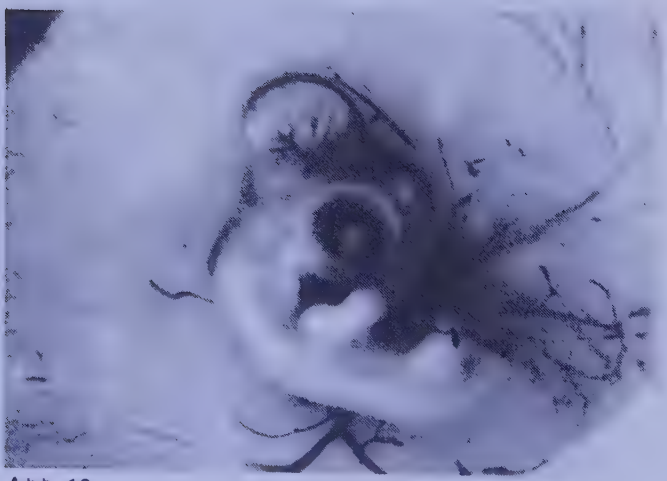

Abb. 12

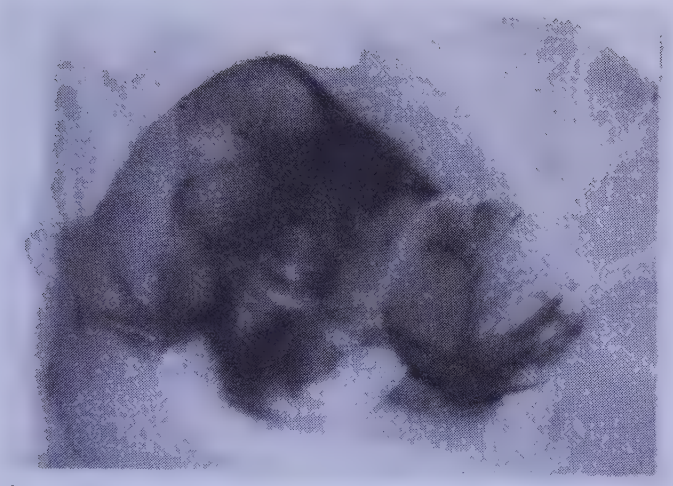

Abb.13

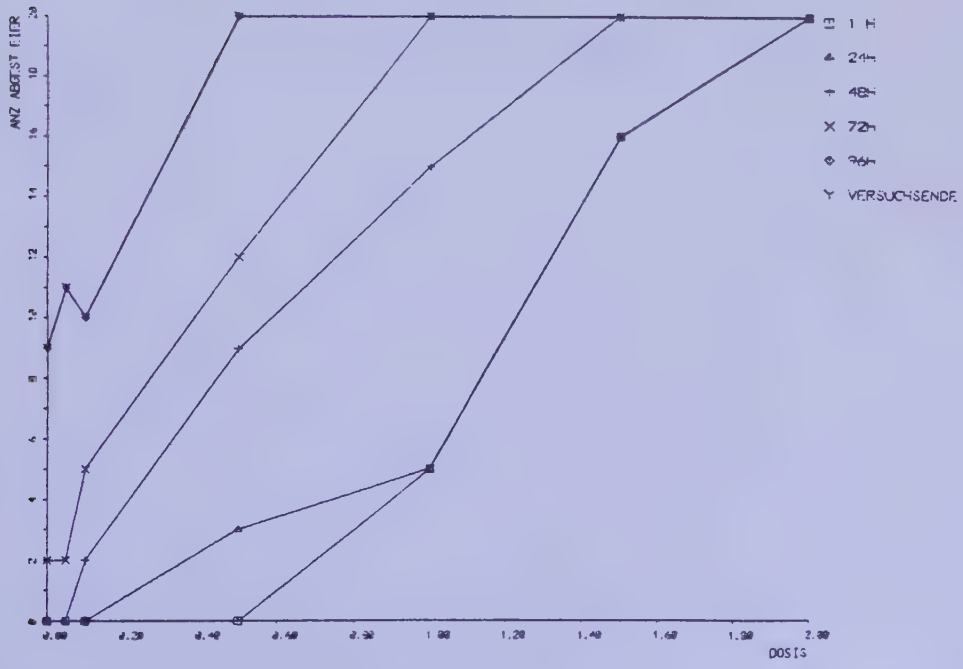

Abb.14

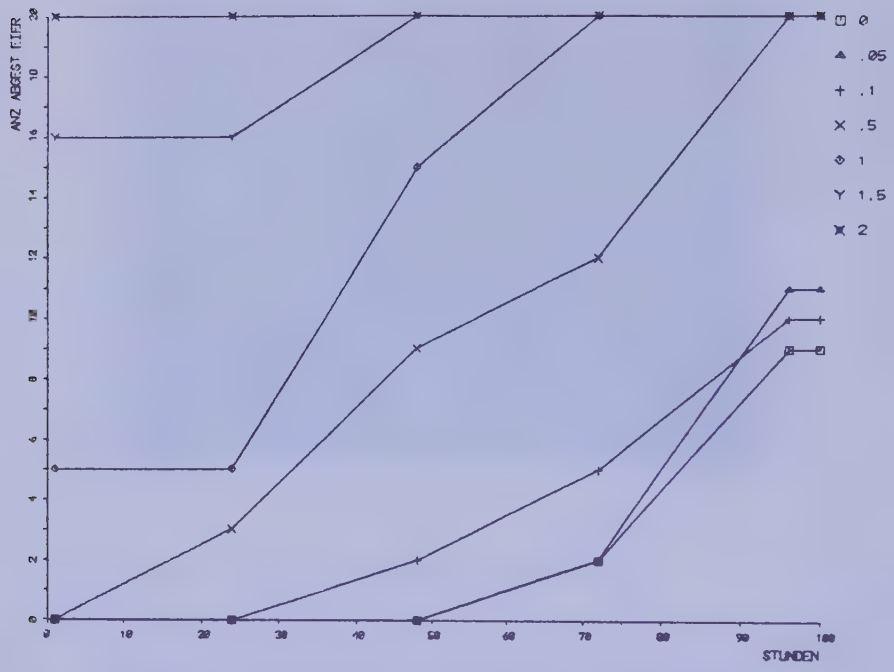

Abb. 15

D A N K S A G U N G

Herrn Professor Dr.med. W. Hilscher, Leiter der Abteilung für experimentelle Pathologie des Medizinischen Institutes für Umwelthygiene an der Universität Düsseldorf, danke ich für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung bei der Arbeit und für seine stete Ansprechbereitschaft.

Frau Hilscher schulde ich Dank für die Computerberechnungen der statistischen Auswertungen.

Schließlich bin ich noch Frau Weishaupt verpflichtet, die durch die reibungslose Beschaffung des Nachschubes an Eiern für einen zügigen Ablauf der Experimente sorgte.

L E B E N S L A U F

Name:	Pfeffer
Vorname:	Gerald
Geburtsdatum:	17.07.1950
Geburtsort:	Berlin
Eltern:	Vater: Kurt Pfeffer, Zahnarzt Mutter: Ruth-Gerti Pfeffer, geb. Pirwitz
Schulbesuch:	1957 - 1960 27. Grundschule, Berlin 1960 - 1961 Gerswida-Schule, Essen 1961 - 1970 Humboldt-Gymnasium, Essen 1970 - 1971 private höhere Tages- und Abendschule "W. Haring", Essen
Universität:	1971 - 1977 Biologie, Universität Köln 1977 - 1982 Zahnmedizin, Universität Düsseldorf
Assistentenzeit:	1982 - 1984 Ausbildungsassistent in Zahnarztpraxis, Ratingen

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353